

УДК 547.583, 615.273

## ВЛИЯНИЕ *N*-АДАМАНТОИЛ- $\alpha$ -АМИНОКИСЛОТ И *N*-(ПИРИДИН-4-ИЛ)-3-(1-АДАМАНТАНКАРБОКСАМИДО-ЭТИЛ)ИНДОЛА НА ИНДУЦИРОВАННУЮ АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ

© 2010 В.А. Ермохин, Н.А. Кленова, Ю.П. Зарубин, Е.Ф. Ширмаер, П.П. Пурыгин

Самарский государственный университет

Поступила в редакцию 05.10.2010

*N*-(1-адамантоил)-D,L-гистидин уменьшает агрегацию тромбоцитов, индуцируемую серотонином на 41%. 3-(1-Адамантанкарбоксамидоэтил)индол усиливает серотонин-индуцированную агрегацию на 26%.

Ключевые слова: агрегация тромбоцитов, серотонин

Производные аминокислот, в частности *N*-ацил- $\alpha$ -аминокислоты, вызывают постоянный интерес благодаря своему исключительно широкому спектру действия и чрезвычайно важной роли в жизнедеятельности клетки. Наличие в молекуле ацильного фрагмента придает этим соединениям гидрофобные свойства и позволяет проявлять поверхностно-активные и седативные свойства. Для лечения болезни Паркинсона известен лекарственный препарат допамантин *N*-(1-адамантилкарбонил)-3,4-дигидро-ксифенилэтиламин [1]. Химия и сведения по фармакологической активности *N*-адамантоилированных пептидов изложены лишь в нескольких публикациях [2-4]. Ранее было показано, что объемный адамантильный заместитель оказывается необходимым для увеличения сродства соединений к 5-HT<sub>2</sub>-рецепторам тромбоцитов [5, 6]. В данной статье изучено влияние двух *N*-адамантоил- $\alpha$ -аминокислот и производного триптамина на индуцированную серотонином агрегацию тромбоцитов.

**Экспериментальная химическая часть.** В качестве объектов для *N*-адамантоилирования были выбраны две аминокислоты — D,L-гистидин 2а и D,L-триптофан 2б, которые декарбоксилируются в организме до

биогенных аминов, и один биогенный амин — 2-(3'-индолил)этиламин (триптамин) для исследования действия на серотониновые рецепторы тромбоцитов. Известно два основных способа синтеза *N*-ациламинокислот — ацилирование аминокислот либо ацилирование их эфиров [7, 8]. Ацилирование аминокислот хлорангидридами — один из наиболее распространенных методов для получения *N*-ациламинокислот. Он был положен в основу промышленного производства целой серии продуктов, например «медиланов» — производных саркозина. Существуют различные модификации этого метода. Реакцию проводят в водных растворах, водно-органических смесях, содержащих 30-50% инертного водорастворимого органического растворителя и в системах двух несмешивающихся растворителей, одним из которых является вода. Следует отметить, что в последнем случае, например в системе вода-толуол, выход целевого продукта значительно снижается [7].

При исследовании кинетики ацилирования  $\alpha$ -аминокислот бензоилхлоридом в водных растворах показано [8], что аминогруппа изучаемых аминокислот обладает высокой реакционной способностью, которая определяется формой ее существования в растворе. Наиболее реакционноспособными являются формы, имеющие свободные аминогруппы H<sub>2</sub>NCHR<sup>-</sup>COO<sup>-</sup> (А) и H<sub>2</sub>NCH(R)COOH (В), при этом активность формы А выше. В воде реакции протекают медленно, в связи с чем увеличивается вероятность гидролиза амидной связи, особенно при нагревании.

Ацилирование D,L-триптофана осуществляли 1-адамантоилхлоридом в присутствии триэтиламина при нагревании в течение 17 ч в среде абсолютного толуола. Выход составил

*Ермохин Владимир Анатольевич, кандидат химических наук, инженер кафедры органической, биоорганической и медицинской химии. E-mail: ertochin@mail.ru*

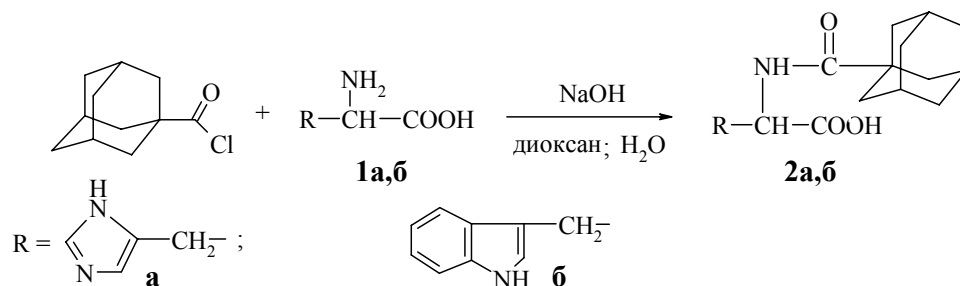
*Кленова Наталья Анатольевна, доктор биологических наук, профессор кафедры биологической химии*  
*Зарубин Юрий Павлович, кандидат химических наук, старший преподаватель кафедры органической, биоорганической и медицинской химии*

*Ширмаер Екатерина Федоровна, студентка*

*Пурыгин Петр Петрович, доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой органической, биоорганической и медицинской химии*

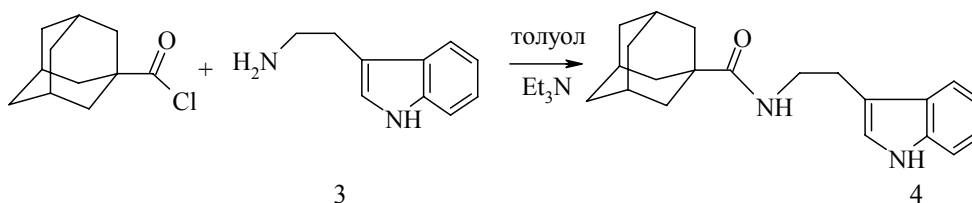
37%. Нами установлено, что выход целевого продукта увеличивается при проведении реакции в водно-диоксановой среде. При адамантоилировании D,L-гистидина и D,L-триптофана в присутствии гидроксида натрия в среде диоксан/вода (1:1) найдено, что для повышения степени чистоты получаемого продукта

необходимо соблюдение ряда условий (pH=10, температура не выше 25 С, интенсивное перемешивание в процессе добавления 1-адамантоилхлорида). Для выделения чистых веществ реакционную массу упаривают, экстрагируют спиртом, отгоняют растворитель и осадок очищают флаш-хроматографией.



При ацилировании гистидина 1а и триптофана 1б по методу Шоттен–Баумана в водно-диоксановой среде выход продукта увеличился до 53%, время реакции сократилось до 2 ч. Синтез 3-(1-адамантанкарбоксамидоэтил)

индола 4 осуществлялся взаимодействием триптамина 3 в толуоле в присутствии триэтиламина с хлорангидридом 1-адамантанкарбоновой кислоты по следующей схеме



При ацилировании 2-(3'-индолил) этиламина 6 выход целевого продукта увеличивается по сравнению с триптофаном 3б. Это можно объяснить протонированием аминогруппы в D,L-триптофане 2б и дополнительным стерическим препятствием со стороны карбоксильной группы. В табл. 1 и 2 представлены время протекания реакций и данные ИК и ЯМР <sup>1</sup>H спектров полученных соединений.

связей С–Н адамантанового ядра и С=О фрагмента амидных и карбоксильных групп. Также наблюдается поглощение ν(N–H) в области 3413–3217 см<sup>-1</sup>. В спектрах <sup>1</sup>H ЯМР наблюдаются три сигнала протонов каркаса адамантана в области 1.70–2.21 м.д., также присутствует сигнал протона у азота гетероцикла в области 8.40–8.88 м.д. (1H). Полученные соединения исследованы на агрегационную активность в отношении тромбоцитов крови человека в присутствии серотонина.

В ИК спектрах соединений наблюдаются полосы поглощения сильной интенсивности 2908–2847 см<sup>-1</sup> и 1720–1654 см<sup>-1</sup>, соответствующие валентным колебаниям

**Таблица 1.** Температуры плавления, R<sub>f</sub>, время протекания реакций и выходы соединений 1а, 1б, 4

	Название соединения	Т.пл., °С	R <sub>f</sub>	Время реакции, ч	Выход %
2а	N-(1-адамантоил)-D,L-гистидин	194–196	0,45*	2	55
2б	N-(1-адамантоил)-D,L-триптофан	84–86	0,64*	2	53
				17***	37***
4	3-(1-адамантанкарбоксамидоэтил)индол	70	0,87**	5***	57***

Примечание: \* - этанол, \*\* - этилацетат, \*\*\* - данные при проведении реакции в толуоле в присутствии триэтиламина

Таблица 2. Данные ИК и ЯМР  $^1\text{H}$  спектров для соединений 1a, 1б и 4

Соединение	ИК спектр, $\nu$ , $\text{см}^{-1}$		Спектр ЯМР $^1\text{H}$ , $\delta$ (м.д., от ТМС); $J$ , Гц	
	$\nu(\text{C-H})$ Ad	$\nu(\text{N-H})$ , $\nu(\text{C=O})$	$\text{H}_{\text{Ad}}$ , $\text{H}_{\text{CH}_2}$	$\text{H}_{\text{Ar(Het)}}$ , $\text{H}_{\text{NH}}$
1a	2904, 2847	3413, 1700, 1640	1.64 м (6H, $\text{CH}_2$ ), 1.76 д (6H, $\text{CH}_2$ ), 1.92 с (3H, CH), 2.92 м (2H, $\text{CH}_2$ ), 3.99 к (8 Гц, 1H, CH)	6.59 с (1H, Het), 6.96 д (6 Гц, 1H, Het), 7.41 с (1H, NH), 8.43 с (1H, NH Het)
1б	2908, 2850	3394, 3317, 1720, 1693, 1654	1.65 м (6H, $\text{CH}_2$ ), 1.76 м (6H, $\text{CH}_2$ ), 1.94 с (3H, CH), 2.80 с (2H, $\text{CH}_2$ ), 4.15 м (1H, CH)	6.96 м (1H, Het), 7.04 м (1H, Het), 7.10 с (1H, Het), 7.27 м (1H, Het), 7.45 м (1H, Het), 7.53 м (1H, NH), 8.40 с (1H, NH, Het)
4	2908, 2850	3413, 3217, 1693, 1640	1.65 м (6H, $\text{CH}_2$ ), 1.76 м (6H, $\text{CH}_2$ ), 1.94 с (3H, CH), 2.79 т (7,8 Гц, 2H, $\text{CH}_2$ ) 3.30 к (7,8 Гц, 2H, $\text{CH}_2$ )	6.96 т (7,0 Гц, 1H, Het), 7.04 т (7,0 Гц, 1H, Het), 7.10 д (4 Гц, 1H, Het), 7.33 д (8 Гц, 1H, Het), 7.41 т (6 Гц, 1H, Het), 7.53 д (8 Гц, 1H, NH), 8.88 с (1H, NH Het)

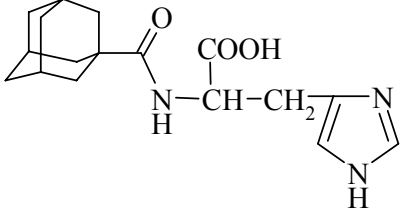
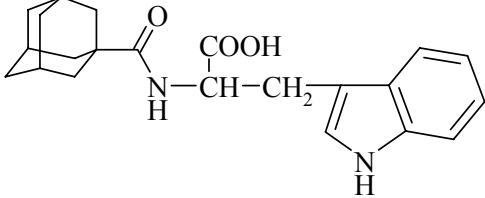
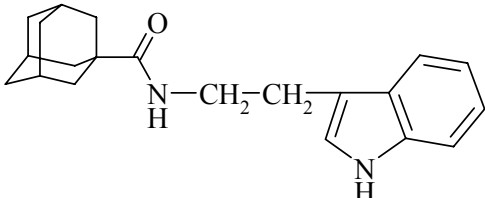
**Экспериментальная биологическая часть.** Для выявления у исследуемых соединений синергетических свойств по отношению к серотониновым рецепторам нами проведены опыты с серотонином в качестве активатора агрегации. Для получения богатой тромбоцитами плазмы крови использовали свежезабранную донорскую кровь с 3,8% цитрата натрия в качестве антикоагулянта. Кровь центрифугировали при 250 g, 10 минут, полученную плазму стандартизировали по количеству тромбоцитов, внося физиологический раствор (рН 7,2) до получения оптической плотности (600 нм, 1 см) 0,5 ед. Агрегацию тромбоцитов в присутствии исследуемых соединений исследовали фотометрическим методом Борна, основанном на определении оптической плотности плазмы, обогащенной тромбоцитами. В качестве агрегирующего агента использовали серотонина креатининсульфат фирмы «Merck» в конечной концентрации  $1 \cdot 10^{-5}$  М. Интенсивность агрегации оценивали по падению оптической плотности (600 нм, 1 см, СФ-46) за 30 минут и выражали в  $\text{у.е.} = \Delta_{\text{оп}} \times 1000$ .

**Результаты исследований и их обсуждение.** Определяли изменения агрегирующей активности тромбоцитов при воздействии на них синтезируемых соединений 1a, 1б, 4 и серотонина креатининсульфата. Для серотонина на мембране тромбоцитов существует два типа рецепторов – ионные каналы и рецепторы, сопряженные с G-белками, поэтому, являясь их лигандом, он может индуцировать процессы агрегации тромбоцитов двумя путями. Влияние соединений на скорость агрегации тром-

боцитов может быть обусловлено их способностью усиливать сродство индуктора агрегации к рецепторам (синергисты) или каким-либо образом блокировать доступ лиганда к своему рецептору. Кроме того, возможным является агонистическое влияние на рецептор с малой константой ассоциации агониста с рецепторной молекулой.

Показано что, *N*-адамантильное производное биогенного амина триптамина 4 проявляет свойства слабого синергиста, при введении карбоксильной группы эффект полностью пропадает для 1б, а замена индольного гетероцикла на имидазольный в *N*-(1-адамантил)-D,L-гистидине 1a приводит к уменьшению агрегирующего эффекта серотонина на 38% (рис. 3 и табл. 3). Полученные результаты с добавлением исследуемых веществ при индукции агрегации тромбоцитов серотонином показали способность одного из соединений блокировать проведение сигнала через сопряженные с G-белками серотониновые рецепторы. Наиболее активное уменьшение серотонин-индуцируемой агрегации оказывает соединение 1a, в молекуле которого расстояние между атомом азота пиридина и атомом кислорода амидной группы соответствует 5,75 Å, оно примерно такое же, как в молекуле серотонина (табл. 3). Это согласуется и с теоретическим предсказанием возможной антисеротонинэргической активности у данного соединения и является еще одним обоснованием того, что уменьшение агрегации, вероятно, связано с конкурентным блокированием серотониновых рецепторов.

**Таблица 3.** Влияние производных адамантана на серотонин-индуцированную агрегацию тромбоцитов человека *in vitro*

№	Структура соединений	Интенсивность агрегации, усл. ед		Характер действия
		контроль	опыт	
1a		34,2±3,8	20,8±0,7*	антагонист
1б		27,8±1,9	24,3±1,0	не проявляет активности
4		33,03,4	46,0±0,9*	слабый синергист

Примечание: \* уровень достоверности  $P < 0,01$

Таким образом, полученные экспериментальные данные подтверждают биологическую активность исследуемых соединений по отношению к тромбоцитам крови человека *in vitro*. Результаты наших исследований подтверждают известные литературные данные о том, что введение в молекулу производного высоколипофильного адамантового радикала усиливает его взаимодействие с гидрофобными областями рецепторных молекул [1, 2], соединение 1б имеет подобную активность, препятствуя проведению сигнала активации серотонинном.

**Выводы:** исследуемые производные адамантана оказывают различное действие на индуцируемую агрегацию тромбоцитов человека, было найдено 2 соединения, проявляющих свойства антагониста и синергиста, при серотонин-индуцированной агрегации тромбоцитов человека *in vitro*, что является следствием их способности влиять на функционирование тромбоцитарных рецепторов. Показано что наибольшая активность характерна для *N*-(1-адамантоил)-*D,L*-гистидина проявляющего свойства антагониста (увеличение на 38%). Эффект усиления агрегации в присутствии 3-(1-адамантанкарбоксамидоэтил)индола на 39%

предположительно обусловлен способностью данного производного увеличивать эффективность функционирования гликопротеиновых рецепторов на поверхности тромбоцитов. Механизм влияния данных производных адамантана на серотонин-индуцированную агрегацию требует дальнейшего изучения.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Ковтун, В.Ю. Использование адамантанкарбоновых кислот для модификации лекарственных средств и биологически активных соединений / В.Ю. Ковтун, В.М. Плахотник // Хим.-фарм. журн. 1987. Т. 28, № 8. С. 931-940.
2. Dok, Q. Synthesis and biological properties of enkephalin-like peptides containing adamantylalanine in position 4 and 5 / Q. Dok, R. Schwyzer // Helv chim Acta. 1981. V. 64, №7. P. 2084-2089.
3. Pfeipfe, F.R. *N*-Acylation of tyrosine during peptide synthesis / F.R. Pfeipfe, P.A. Chambers, E.E. Helbert et al. // J. Med. Chem. 1984. V. 27. P.325-341.
4. Данилин, А.А. Реакции *C, N, O*-алкилирования  $\alpha$ -бромкетонами адамантанового ряда. / Дисс. канд. хим. наук. Самара. 2000. С. 89-93.
5. Fujio, M. *N*-[1-(2-Phenylethyl)pyrrolidin-3-yl]-1-adamantanecarboxamides as novel 5-HT<sub>2</sub> receptor antagonists / M. Fujio, T. Kuroita, Y. Sakai et al. // J. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2000. V. 10. P. 2457-2461.

6. *Bojarski, A.J.* The influence of substitution at aromatic part of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline on *in vitro* and *in vivo* 5-HT<sub>1A</sub>/5-HT<sub>2A</sub> receptor activities of its 1-adamantoyloaminoalkyl derivatives / *A.J. Bojarski, M.J. Mokrosz et al.* // *J. Bioorg. Med. Chem.* 2002. V. 10. P. 87-95.
7. *Михалкин, А.П.* Получение, свойства, применение *N*-ацил- $\alpha$ -аминокислот / *А.П. Михалкин* // *Успехи химии.* 1995. Т. 64, вып. 3. С. 275-280.
8. *Акимова, А.А.* Ациламинокислоты синтез и свойства / *А.А. Акимова, О.И. Галахов* // *Изв. Вузов. Химия и химическая технология.* 1987. Т. 30, № 6. С. 114-117.

**INFLUENCE OF N-ADAMANTOIL-A-AMINO ACIDS AND N-(PYRIDINE-4-IL) - 3 (1-ADAMANTAN CARBOXYAMIDO-ETHYL) INDOL ON INDUCED AGGREGATION OF THROMBOCYTES**

© 2010 V.A. Ermohin, N.A. Klenova, Yu.P. Zarubin, E.F. Shirmayer, P.P. Purygin

Samara State University

*N*-(1-adamantol)-D,L-histidine reduces thrombocytes aggregation, induced by serotonin on 41%. 3 (1-adamantancarboxamidoethyl)indol strengthens serotonin-induced aggregation on 26%.

Key words: *thrombocytes aggregation, serotonin*

*Vladimir Ermohin, Candidate of Chemistry, Engineer at the Department of Organic, Bioorganic and Medical Chemistry. E-mail: ermochin@mail.ru*

*Nataliya Klenova, Doctor of Biology, Professor at the Biochemistry Department*

*Yuriy Zarubin, Candidate of Chemistry, Senior Lecturer at the Department of Organic, Bioorganic and Medical Chemistry*

*Ekaterina Shirmayer, Student*

*Petr Purygin, Doctor of Chemistry, Professor, Head of the Department of Organic, Bioorganic and Medical Chemistry*